

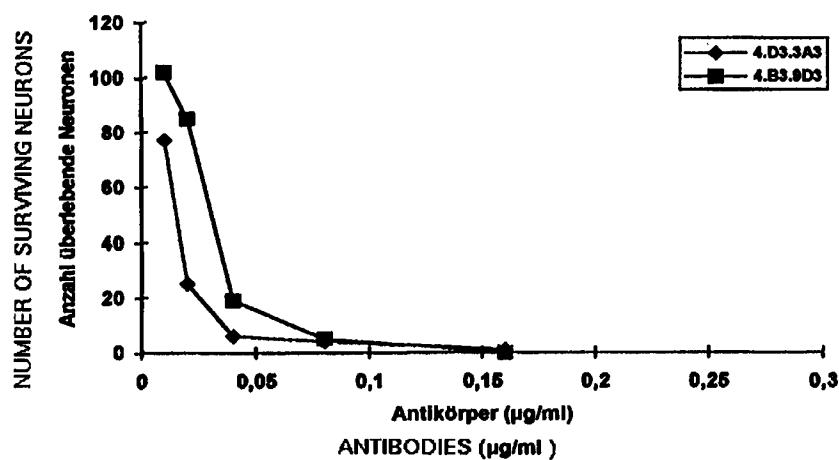


(51) Internationale Patentklassifikation⁶ : C07K 16/22, C12N 5/20, C12P 21/08, G01N 33/577, 33/68		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 98/21245
			(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 22. Mai 1998 (22.05.98)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP97/05956	(74) Gemeinsamer Vertreter: BOEHRINGER MANNHEIM GMBH; Werk Penzberg, Patentabteilung (RE-TB), Postfach 11 52, D-82372 Penzberg (DE).
(22) Internationales Anmeldedatum: 29. Oktober 1997 (29.10.97)	
(30) Prioritätsdaten: 96117941.3 8. November 1996 (08.11.96) EP (34) Länder für die die regionale oder internationale Anmeldung eingereicht worden ist: DE usw.	(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
97100665.5 17. Januar 1997 (17.01.97) EP (34) Länder für die die regionale oder internationale Anmeldung eingereicht worden ist: DE usw.	
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BOEHRINGER MANNHEIM GMBH [DE/DE]; Sandhofer Strasse 116, D-68305 Mannheim (DE).	Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> <i>Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>
(72) Erfinder; und	
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BARTKE, Ilse [DE/DE]; Eichenstrasse 25A, D-82347 Bernried (DE). EBERLE, Walter [DE/DE]; Waxensteinstrasse 42, D-82347 Bernried (DE). KOLBECK, Roland [DE/DE]; Wiesentfelserstrasse 48, D-81249 München (DE). BARDE, Yves-Alain [CH/DE]; Merowingerstrasse 39, D-82166 Gräfelfing (DE).	

(54) Title: HIGHLY AFFINE ANTIBODY AGAINST HUMAN BDNF, METHOD FOR THE PRODUCTION AND USE THEREOF

(54) Bezeichnung: HOCHAFFINE ANTIKÖRPER GEGEN HUMAN-BDNF, VERFAHREN ZU IHRER HERSTELLUNG UND VERWENDUNG



(57) Abstract

An antibody against human BDNF which inhibits the survival of afferent ganglions neurons at 90 % is especially suited for diagnostic and therapeutic purposes.

(57) Zusammenfassung

Ein Antikörper gegen Human-BDNF, welcher in einer Konzentration von 500 ng/ml das Überleben von Nodosumneuronen zu 90 % inhibiert, ist besonders für diagnostische und therapeutische Zwecke geeignet.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

**Hochaffine Antikörper gegen Human-BDNF,
Verfahren zu ihrer Herstellung und Verwendung**

Die Erfahrung betrifft hochaffine Antikörper gegen Human-BDNF (Brain-derived neurotrophic factor), Verfahren zu ihrer Herstellung und ihre Verwendung sowohl in der Diagnostik als auch zur Therapie.

BDNF ist ein Protein aus der Gruppe der Neurotrophine, welches eine Schlüsselrolle in der neuronalen Entwicklung einnimmt. Die Neurotrophine umfassen eine Gruppe von stark homologen Proteinen. Bekannte Neurotrophine sind beispielsweise Nerve Growth Factor (NGF), BDNF, Neurotrophin 3 - 6 (R.M. Lindsay et al., Trends Neurosci. 17 (1994) 182 - 190). Die Bedeutung von BDNF liegt darin, daß BDNF das Überleben und die Regulation der phänotypischen Expression einer Vielzahl von Neuronen des zentralen und peripheren Nervensystems unterstützt und reguliert. Damit hat BDNF einen Einfluß auf verschiedene neurologische Erkrankungen, wie auf die Alzheimer Krankheit und die Parkinson Krankheit (H.S. Phillips, Neuron 7 (1991) 695 - 702 und R.M. Lindsay et al., Expl. Neurol. 124 (1993) 103 - 118).

Damit ist die Bestimmung von BDNF in Körperflüssigkeiten von großer Bedeutung für die Diagnose und die Verlaufskontrolle von neurologischen Erkrankungen. Die Bestimmung von BDNF in einem Immunoassay ist von S.F. Radka et al. in Brain Research 709 (1996) 122 - 130 beschrieben. In dieser Publikation wird ein Sandwich Immunoassay unter Verwendung eines monoklonalen Antikörpers (MAK) und eines polyklonalen Antikörpers (PAK) gegen Human-BDNF beschrieben (MAK-PAK ELISA). Mit diesem Testverfahren wurde rekombinanter BDNF in Konzentrationen von 10 pg/ml identifiziert, wobei keine Kreuzreaktion mit NT-3, NT-4/5 oder NGF bei Konzentrationen bis zu 100 ng/ml gefunden wurde. Von den Autoren wurden zwei BDNF-spezifische monoklonale Antikörper des Isotyps IgG1 gefunden, die aber nicht gemeinsam für einen Immunoassay (MAK-MAK ELISA) geeignet sind. Im übrigen sind die von Radka beschriebenen Antikörper nicht in der Lage, die biologische Aktivität von BDNF zu blockieren. Die Antikörper wurden erhalten nach Immunisierung von Mäusen mit rekombinantem BDNF aus E.coli. Zur Immunisierung wurde gemäß S.F. Radka et al., J. Immunol. 128 (1982) 2804 - 2806 vorgegangen. Der von Radka genannte

monoklonale Antikörper RP 43-01, der eine hohe Affinität besitzen soll, blockiert das BDNF Immunoassay-Signal in Plasma bei einer Konzentration von 10 µg/ml.

Von R & D Systems, Europe LTD., Abingdon (GB), wird unter der Katalog-Nr. MAB248 ein monoklonaler Antikörper gegen Human-BDNF vertrieben (Clone: 35928.11). Dieser Antikörper wurde hergestellt nach Immunisierung von Mäusen mit rekombinant hergestelltem BDNF aus der Insektenzelllinie SF21. Der Antikörper zeigt keine Kreuzreaktivität mit NGF, NT-3 und NT-4. Als Nachweisgrenze für BDNF in einem ELISA wird 12,5 ng/well, entsprechend 125 ng/ml, angegeben.

Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht darin, hochaffine Antikörper, vorzugsweise monoklonale Antikörper, gegen Human-BDNF bereitzustellen, die eine weitere Steigerung der Empfindlichkeit und Spezifität von immunologischen Bestimmungen von Human-BDNF (insbesondere in einem MAK-MAK ELISA) erlauben, die biologische Aktivität von BDNF blockieren (inhibierende Antikörper) und im Western Blot und auch therapeutisch verwendbar sind.

Die Aufgabe wird gelöst durch einen Antikörper gegen Human-BDNF, welcher in einer Konzentration von 500 ng/ml das Überleben von Nodosumneuronen zu 90 % und/oder mehr inhibiert. Vorzugsweise inhibiert der erfindungsgemäße Antikörper bei einer Konzentration von 250 ng/ml, besonders bevorzugt bereits bei Konzentrationen von 120 ng/ml, zu 90 % und/oder mehr das Überleben von Nodosumneuronen. Die erfindungsgemäßen Antikörper sind sogar in der Lage, auch noch in Konzentrationen von 80 ng/ml das Überleben von Nodosumneuronen quantitativ (zu mehr als 90 %) zu inhibieren.

Die Bestimmung der Wirkung von Antin-Human-BDNF-Antikörpern auf das Überleben (Differenzierung) primärer Nodosumneuronen (nodose ganglion (NG) und dorsal root ganglion (DRG) neurons) ist das wissenschaftlich anerkannte Kriterium zur Bestimmung der Inhibition von Human-BDNF, welches der in-vivo-Situation weitestgehend entspricht (R.M. Lindsay et al., Development Biology 112 (1985) 319 - 328). Es wurde gezeigt, daß das Überleben (bzw. die Stimulation) von NG von der Gegenwart von BDNF oder NT-3 und das Überleben bzw. die Stimulation von DRG von der Gegenwart von NGF, BDNF oder NT-3 abhängig ist. Antikörper gegen BDNF sind in der Lage, das Überleben von NG- und DRG-Neuronen zu beeinflussen. Zusätzlich kann mit den erfindungsgemäßen Antikörpern, vorzugsweise den monoklonalen Antikörpern, in einem Sandwich Immunoassay ein BDNF-Signal

mit rekombinantem Human-BDNF noch bei Konzentrationen unter 5 pg/well, (50 pg/ml) vorzugsweise zwischen 1 und 5 pg/well (10 - 50 pg/ml) beobachtet werden.

Die Bestimmung des Überlebens von Nodosumneuronen erfolgt im wesentlichen dadurch, daß Nodosumganglien in Einzelzellen dissoziiert werden und diese Zellen mit humanem BDNF, mit und ohne erfindungsgemäßen Antikörper, in verschiedenen Konzentrationen inkubiert werden. Die durch humanen BDNF erreichte Stimulierung wird als Standardwert (0 %-Inhibition) verwendet. Ein Meßwert ohne Zusatz von humanem BDNF wird als Standardwert für eine 100 %ige Inhibition verwendet.

Es hat sich gezeigt, daß die Immunisierung von Mäusen mit rekombinantem Human-BDNF keine befriedigenden Ergebnisse bei der Bildung von Antikörpern gegen Human-BDNF ergibt. Bei üblichen Immunisierungsverfahren gemäß dem Stand der Technik werden nur wenige Antikörper mit geringer Affinität erhalten. Es hat sich überraschenderweise gezeigt, daß erst dann in großem Umfang hochaffine Antikörper gegen Human-BDNF erhalten werden, wenn vor der Immunisierung mit Human-BDNF mit Fisch-BDNF immunisiert wird. Fisch-BDNF ist in R. Götz et al., J. Neurochemistry 59 (1992) 432 - 442 beschrieben. Erst dadurch ist es möglich, hochaffine monoklonale Antikörper gegen Human-BDNF zu erhalten, die auch einen spezifischen und reproduzierbar herstellbaren MAK-MAK ELISA ermöglichen. Die erfindungsgemäßen Antikörper sind insbesondere als monoklonale Antikörper für die Immunhistochemie (z.B. an Gewebsschnitten) vorzugsweise in einem Western Blot geeignet.

Vorzugsweise wird über einen Zeitraum von mehreren Monaten (6 - 12 Monate) immunisiert. Dabei erfolgt die Erstimmunisierung eines Säugetiers, vorzugsweise Maus oder Ratte, mit Fisch-BDNF, die Folgeimmunisierungen (mindestens eine) mit Human-BDNF (natürlich oder rekombinant) oder vorzugsweise abwechselnd mit Human-BDNF und Fisch-BDNF. Ein besonders bevorzugtes Immunisierungsschema ist in den Beispielen dargestellt.

Unter einem Antikörper gemäß der Erfindung ist ein Protein zu verstehen, welches aus einem oder mehreren Polypeptiden besteht, die im wesentlichen durch Antikörnergene codiert werden. Solche Antikörnergene beinhalten sowohl Gene für konstante als auch variable Regionen. Antikörper können in einer Vielzahl von verschiedenen Formen, beispielsweise FvFab und F(ab)₂ sowie als Einzelketten vorkommen (Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 (1988) 5879 - 5883, Bird et al., Science 242 (1988). Die erfindungsgemäßen Antikörper kön-

nen sowohl monoklonale als auch polyklonale Antikörper sein, wobei monoklonale Antikörper und deren Fragmente bevorzugt sind.

Die erfindungsgemäßen Antikörper umfassen vorzugsweise wenigstens zwei leichte Polypeptidketten und zwei schwere Polypeptidketten. Jede der schweren und leichten Ketten enthält eine variable Region (üblicherweise mit aminoterminalen Teil der Polypeptidkette bezeichnet (welche eine Bindedomäne enthält, die mit dem Antigen (Human-BDNF) interagiert)). Jede der leichten und schweren Polypeptidketten enthält ebenfalls eine konstante Region in der Polypeptidkette (üblicherweise als Carboxyterminus bezeichnet), welcher die Bindung des Antikörpers an Zellen oder Gewebe des Wirtsorganismus oder Faktoren des Immunsystems, wie phagozytische Zellen oder eine erste Komponente (C1q) des Komplementsystems, vermitteln. Üblicherweise sind die leichten und schweren Ketten komplett Ketten, die im wesentlichen aus einer variablen und kompletten konstanten Region bestehen. Die variablen Regionen des Antikörpers gemäß der Erfindung können an konstante Regionen von verschiedenen Isootypen gebunden sein. Beispielsweise kann ein Polypeptid, welches die variable Region einer Anti-Human-BDNF-Antikörper schweren Kette des $\gamma 1$ Isotyps besitzt, gebunden sein an ein Polynukleotid, welches die konstante Region einer schweren Kette einer anderen Klasse oder Subklasse codiert.

Es ist außerdem möglich, daß eine oder mehrere Aminosäureaustausche, insbesondere konervative Aminosäureaustausche, in den Aminosäuresequenzen der leichten oder schweren Ketten der erfindungsgemäßen Antikörper durchgeführt werden können, ohne daß im wesentlichen die Charakteristik der Antikörperbindung beeinflußt oder die Affinität verschlechtert wird. Bevorzugt werden solche Aminosäuresubstitionen, -additionen oder -deletionen in den konstanten oder variablen Regionen, den framework-Sequenzen und den complementary determining sequences (CDR) durchgeführt. Konservative Aminosäureaustausche, welche die Struktur des Antikörpers nicht oder nur geringfügig beeinflussen, sind bevorzugt. Antikörperfstrukturen sind beispielsweise beschrieben in: Creighton, T.E., Proteins: Structures and Molecular Properties, Publ. Freeman, New York (1984); Branden, C., Tooze, J., Introduction to Protein Structure, Garland Publishing, New York (1991); Fornton et al., Nature 354 (1991) 105. Die erfindungsgemäßen Antikörper können sowohl monoklonale als auch polyklonale Antikörper, Fragmente davon, chimäre oder humanisierte Antikörper sein, solange die charakteristischen Eigenschaften der hochaffinen Bindung an Human-BDNF erhalten bleibt. Ebenfalls geeignet sind verkürzte Antikörperfragmente, welche beispielsweise lediglich die CDR-Regionen oder Teile davon enthalten, welche in der Lage sind, hochaffin an Human-BDNF zu

binden. Zur Verwendung in immunologischen Tests sind die Antikörper vorzugsweise markiert (z. B. radioaktiv oder enzymatisch) sowie immobilisiert bzw. so derivatisiert, daß sie im Rahmen der immunologischen Bestimmung immobilisiert werden können. Antikörper des IgG1-Isotyps sind bevorzugt.

Vorzugsweise werden die erfindungsgemäßen Antikörper zur Diagnose und Bestimmung von BDNF in Körperflüssigkeiten wie Serum oder Plasma oder an soliden Gewebsproben wie Gewebsschnitten verwendet. Die immunologische Bestimmung erfolgt in der dem Fachmann geläufigen Weise, wobei die Antikörper in markierter und/oder immobilisierter Form eingesetzt werden können. Üblicherweise wird bei solchen immunologischen Bestimmungen eine Änderung eines Meßsignals verfolgt, die auf der Bindung von mindestens einem erfindungsgemäßen Antikörper an BDNF erfolgt und diese Bindung einer Signaländerung zugeordnet werden kann. Solche Signale sind beispielsweise Farbreaktionen auf Grund von enzymatischen Reaktionen oder Radioaktivität nach Trennung von an BDNF gebundenem und ungebundenem Antikörper.

In einer bevorzugten Ausführungsform sind die Antikörper gemäß der Erfindung auch zur therapeutischen Behandlung von Erkrankungen, bei denen zur Therapie eine Verminderung der BDNF-Konzentration in Körperzellen oder in Körperflüssigkeiten vorteilhaft ist. Besonders bevorzugt wird ein Anti-Human-BDNF-Antikörper zur Neutralisierung der BDNF-Aktivität und Verhinderung des axonalen Sproutings eingesetzt. Das Verhindern des Sproutings führt zur Reduktion bzw. Heilung der Epilepsie.

Bei Epilepsie konnte gezeigt werden, daß der BDNF-Spiegel erhöht ist. Ein inhibierender Antikörper gegen BDNF kann deshalb zur Neutralisierung der BDNF-Aktivität eingesetzt werden und verhindert damit axonales Sprouting. Das Verhindern des Sproutings führt zur Reduktion bzw. zur Heilung der Epilepsie.

Folgende, Antikörper produzierende, Zellkulturen wurden gemäß Budapester Vertrag bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSM), Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, hinterlegt:

Bezeichnung/AK	Hinterlegungsnummer	Hinterlegungsdatum
4.B3.9D3	DSM ACC2272	29.05.1996
4.D3.3A3	DSM ACC2275	18.06.1996
4.F11.1A1	DSM ACC2276	18.06.1996

Die folgenden Beispiele, Publikationen und Abbildungen erläutern die Erfindung, deren Schutzzumfang sich aus den Patentansprüchen ergibt, weiter. Die beschriebenen Verfahren sind als Beispiele zu verstehen, die auch noch nach Modifikationen den Gegenstand der Erfindung beschreiben.

Figurenbeschreibung

Figur 1 zeigt die Kreuzreaktion von erfindungsgemäßen Anti-Human-BDNF-Antikörpern mit BDNF und anderen Neurotrophinen (ELISA: 10 ng Neurotrophin/well).

Figur 2 zeigt die Inhibition des Überlebens von Nodosumneuronen, in Abhängigkeit von der Konzentration der erfindungsgemäßen Antikörper 4.D3.3A3 und 4.B3.9D3 (m-BDNF: 1 ng).

Beispiel 1

BALB/c Mäuse wurden abwechselnd mit Fisch-BDNF und rekombinantem, humanem BDNF (hergestellt in E.coli) intraperitoneal immunisiert. Die Erstimmunisierung erfolgte in kompletten Freund'schen Adjuvants (CFA)-alle weiteren Immunisierungen wurden in inkompletten Freund'schen Adjuvants (IFA) durchgeführt. Die Dosis betrug zwischen 60 - 100 µg. Die Immunisierung erfolgte im ca. 4 wöchigen Abstand (Tabelle 1). Die Immunisierungsdauer betrug insgesamt 9 Monate. Die letzten drei Immunisierungen wurden im Abstand von je einem Tag intravenös (i.v.) durchgeführt. Nach der letzten i.v. Immunisierung erfolgt die Immortalisierung der Milzzellen der immunisierten Tiere mit der Myelomzelllinie P3X63.Ag8.653.

Die Fusion der Milzzellen mit der Myelomzelllinie wird nach dem Standardverfahren gemäß Goding, J.W., J. of Imm. Meth., 39 (1980) 285-308 durchgeführt. Das Fusionsverhältnis Milzzellen : Myelomzellen ist dabei 1:1. Die Fusionsprodukte werden auf 24er Kulturschalen (Nunc) mit HFCS (Boehringer Mannheim GmbH, Kat.-Nr. 1363735) ausgesät. Positive Primärkulturen werden zwei Wochen nach Fusion mit Hilfe eines fluoreszenzaktivierten Zellsorters (Beckton Dickinson) kloniert. Die Zellen werden dabei einzeln in 96er Mikrotiterplatten abgelegt und mit Nutridoma CS-Medium (Boehringer Mannheim GmbH, Kat.-Nr. 1363743) gefüttert. Als Kulturmedium wird anschließend handelsübliches RPMI 1640 mit 10%igem fötalem Kälberserum verwendet.

Zur Gewinnung der monoklonalen Antikörper werden die so erhaltenen Hybridom-Zellklone in vivo expandiert. Dazu werden 5×10^6 Hybridomzellen intraperitoneal in mit Pristan (Sigma Chemical Company, St. Louis, USA) vorbehandelte Mäuse inokkuliert. Nach 10 - 21 Tagen werden je Maus 2-3 ml Ascites entnommen und daraus der monoklonale Antikörper nach herkömmlichen Methoden gewonnen. Die Ausbeute beträgt etwa 3-10 mg IgG/ml Ascites.

Es konnten im Mäusestamm BALB/c nur Antikörper gegen Human-BDNF generiert werden, wenn mit Fisch-BDNF vorimmunisiert und anschließend mit Human-BDNF nachimmunisiert wurde.

Überraschenderweise konnten im Serum keine inhibierenden Antikörper nach der letzten i.v.-Immunisierung nachgewiesen werden. Es wurden aber trotzdem inhibierende monoklonale Antikörper generiert.

Tabelle 1
Immunisierung der BALB/c Mäuse

Datum	Immunisierung	Antigen
16.02.95	Erstimmunisierung 60 µg	Fisch-BDNF
14.03.95	1. Folgeimmunisierung 80 µg	Fisch-BDNF
11.04.95	2. Folgeimmunisierung 60 µg	Fisch-BDNF
	25.04. Serumentnahme	
08.06.95	3. Folgeimmunisierung 60 µg	Fisch-BDNF
04.07.95	4. Folgeimmunisierung 100 µg	Human-BDNF
25.07.95	5. Folgeimmunisierung 100 µg	Human-BDNF
08.08.95	6. Folgeimmunisierung 100 µg	Human-BDNF
	18.08. Serumentnahme	
29.08.	7. Folgeimmunisierung 65 µg	Fisch-BDNF
12.09.95	8. Folgeimmunisierung 65 µg	Fisch-BDNF
	22.09. Serum	
18.10.95	9. Folgeimmunisierung 65 µg	Fisch-BDNF
14.11.95	10. Folgeimmunisierung 65 µg	Fisch-BDNF
	24.11. Serumentnahme	
04.12.95	i.v. 100 µg	Human-BDNF
05.12.95	i.v. 100 µg	Human-BDNF
06.12.95	i.v. 100 µg	Human-BDNF
	07.12. Fusionsserum	

Beispiel 2

Bestimmung der Spezifität der produzierten Antikörper

Um die Spezifität der Antikörper im Kulturüberstand der Hybridomzellen zu erfassen, wird ein Enzyme-Linked Immuno-Sorbent-Assay (ELISA) angewendet.

Dazu werden 96er Mikrotiterplatten (Nunc) mit 50 µl Human-BDNF, Fisch-BDNF und Huhn-BDNF (100 ng/ml) in Carbonatpuffer (Boehringer Mannheim GmbH, Kat.-Nr. 726559) beschichtet, mit 50 µl Kulturüberstand 2 h bei 37°C inkubiert und mit 3 x 250 µl PBS/0,05 % Tween 20 gewaschen. Danach wird mit β-Gal markiertem Schaf-anti-Maus IgG (Amersham) 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, mit 3 x 250 µl/0,05 % Tween gewaschen und die

Nachweisreaktion mit 50 µl Methyl-Umbiliferyl-Galactosid. Nach 20 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur werden die Extinktionen in einem Fluorometer bei 440 nm bestimmt. Die Kreuzreaktion zu den anderen Neurotrophinen wird mit NGF, NT-3, NT-4 und NT-5 bestimmt (Abb.1)

Beispiel 3

Bestimmung der Wirkung der Antikörper auf das Überleben primärer Nodosumneurone

20 Nodosumganglien werden aus Hühnerembryonen (Tag 8) präpariert und durch Trypsinbehandlung in Einzelzellen dissoziiert. Nach einem Präplattierungsschritt werden 2000 Zellen in das well einer 48er well Platte pipettiert. Die Zellen werden über Nacht mit Human-BDNF bzw. Fisch-BDNF stimuliert, d.h. es kommt zum Überleben und Differenzierung der Zellen. Ohne Zugabe von BDNF sterben die Zellen nach 24 - 48 h ab. Durch Zugabe von Antikörpern + BDNF (1 ng) kommt es zu einer starken Inhibition des Überlebens der Zellen (Abb. 2).

Beispiel 4

ELISA Testsystem zur Bestimmung von BDNF in Gewebe, Serum oder Liquor

Streptavidin-beschichtete Mikrotiterplatten werden mit biotinmarkiertem monoklonalen Anti-Human-BDNF-Antikörper 1 h bei 37°C inkubiert. Nach 3maligem Waschen mit PBS-Tween wird die zu messende Probe 2 h bei 37°C oder über Nacht inkubiert. Anschließend wird der identische oder ein zweiter monoklonaler POD-markierter Anti-Human-BDNF-Antikörper dem Reaktionsgefäß für 1 h bei 37°C zugemischt. Die Nachweisreaktion wird mit ABTS® (2,2'-Azino-di-[3-ethylbenz-thiazolinsulfonat (6)]diamoniumsalz) ausgelöst. Die Empfindlichkeit des Testes beträgt <100 pg/ml.

Beispiel 5

Nachweis von BDNF mit <BDNF>4.F11.1A1 im Western Blot

Die Auftrennung von BDNF (Peprotech / 5 - 100 ng) erfolgt mit Hilfe von 10 - 20% SDS - PAGE unter reduzierenden Bedingungen. Das elektrophoretisch getrennte BDNF wird durch Blotting auf eine PVDF-Membran (BM Ident.-Nr. 1722026) transferiert. Es erfolgt eine Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen mit 1% RSA/PBS (30 min/Rt.), der ein Waschschnitt folgt. Die Inkubation des Primärantikörpers (< BDNF > 4.F11.1A1 1 µg/ml)

wird über Nacht, 4°C durchgeführt. Nach einem erneuten Waschschritt wird der Sekundärantikörper Anti-Maus-IgG-POD, Fab-Fragmente (BM Kat.-Nr. 1500686) 1:1000 1 h bei 37°C inkubiert. Durch Waschen wird der überschüssige Sekundärantikörper entfernt, der Nachweis erfolgt mit dem BM Chemiluminescence Blotting Substrate (POD) / (BM Kat.-Nr. 1500708).

Beispiel 6

Nachweis von BDNF mit Antikörper 4.F11.1A1, 4D3.3A3 in der Immunhistochemie

Adulte Ratten wird Pilocarpine hydrochlorid (340mg/kg) intraperitoneal verabreicht. Nach 8 h werden die Tiere mit 4% Paraformaldehyd in 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,4 perfundiert und das Gehirn entnommen. Das Gehirn wird anschließend in verschiedene Regionen geteilt, z.B. basales Vorderhirn, Septum und Basalganglien. Das Gewebe wird dann in aufsteigende Konzentrationen von Sucrose (10-30% in Phosphatpuffer pH 7,4)gelegt. Anschließend wird das Gewebe tiefgefroren; der Gewebeblock wird dann in Schnitte von 50µm geschnitten. Die Schnitte werden dann in Cryoprotektionslösung (30% Sucrose und 30% Ethylenglycol in Phosphatpuffer pH 7,4) aufbewahrt. Die immunhistochemische Anfärbung erfolgt nach Sternberger et al, Immunocytochemistry, Willey - New York (1986). Die Schnitte werden in TPS (0,05M Tris 0,1 M Natriumphosphat, 0,1 M NaCl) mehrmals gewaschen anschließend über Nacht mit monoklonalem anti-BDNF-Antikörper (20 µg/ml in TPS und 0,3% Triton X-100 und 1% Schafserum) inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen werden die Schnitte eine Stunde mit Schaf-Anti-Maus-IgG, Fab-Fragmente (BM 1 500 686) und anschließend mit Peroxidase-Anti-Peroxidase für eine Stunde inkubiert (BM 1 092 626). Nach weiteren Waschschritten wird die Reaktion mit Diaminobenzidin (Sigma) ausgelöst.

Referenzliste

Bird et al., Science 242 (1988)

Branden, C., Tooze, J., Introduction to Protein Structure, Garland Publishing, New York (1991)

Creighton, T.E., Proteins: Structures and Molecular Properties, Publ. Freeman, New York (1984)

Fornton et al., Nature 354 (1991) 105

Goding, J.W., J. of Imm. Meth., 39 (1980) 285-308

Götz, R., et al., J. Neurochemistry 59 (1992) 432 - 442

Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 (1988) 5879 - 5883

Lindsay, R.M., et al., *Development Biology* 112 (1985) 319 - 328
Lindsay, R.M., et al., *Expl. Neurol.* 124 (1993) 103 - 118)
Lindsay, R.M., et al., *Trends Neurosci.* 17 (1994) 182 - 190
Phillips, H.S., *Neuron* 7 (1991) 695 - 702
Radka, S.F., et al., *Brain Research* 709 (1996) 122 - 130
Radka, S.F., et al., *J. Immunol.* 128 (1982) 2804 - 2806
Sternberger et al., *Immunochemistry*, Wiley - New York (1986)

Patentansprüche

1. Antikörper gegen Human-BDNF, welcher in einer Konzentration von 500 ng/ml das Überleben von Nodosumneuronen zu 90 % oder mehr inhibiert.
2. Antikörper nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß er bei einer Konzentration von 120 ng/ml das Überleben von Nodosumneuronen zu 90 % oder mehr inhibiert.
3. Antikörper nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß der Antikörper monoklonal ist.
4. Monoklonale Antikörper gegen Human-BDNF, erhältlich aus den Zelllinien DSM ACC2272, DSM ACC2275 und/oder DSM ACC2276.
5. Zelllinien DSM ACC2272, DSM ACC2275 und DSM ACC2276.
6. Verfahren zur Herstellung eines monoklonalen und/oder polyklonalen Antikörpers gegen Human-BDNF, dadurch gekennzeichnet, daß ein Säugetier in einem ersten Schritt mit Fisch-BDNF immunisiert und im weiteren mindestens einmal mit Human-BDNF immunisiert wird, Antikörper gegen Human-BDNF aus dem Säugetier gewonnen werden und gegebenenfalls einzelne Antikörper isoliert und kloniert werden.
7. Verfahren nach Anspruch 6 zur Herstellung eines monoklonalen Antikörpers gegen Human-BDNF.
8. Verwendung eines Antikörpers gegen Human-BDNF nach den Ansprüchen 1 bis 4 zur Bestimmung von Human-BDNF in Körperflüssigkeiten oder Gewebsschnitten, wobei der Antikörper in markierter und/oder immobilisierter Form eingesetzt wird und ein Signal gemessen wird, welches der Bindung des genannten Antikörpers an Human-BDNF zugeordnet werden kann.

9. Verwendung nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß zwei monoklonale Antikörper gegen Human-BDNF verwendet werden.
10. Verwendung nach Anspruch 8 zur Bestimmung von Human-BDNF an soliden Gewebsproben.

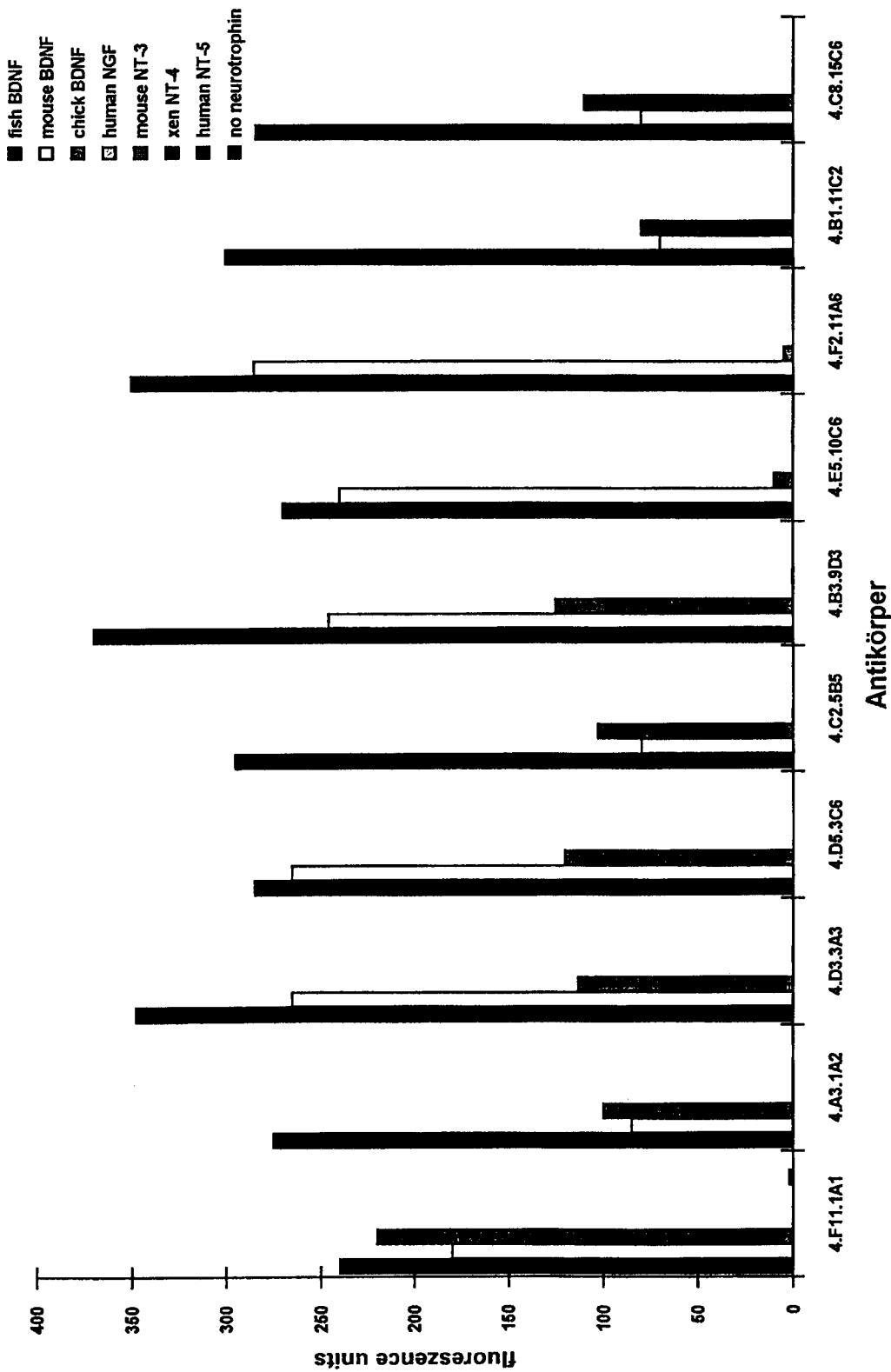
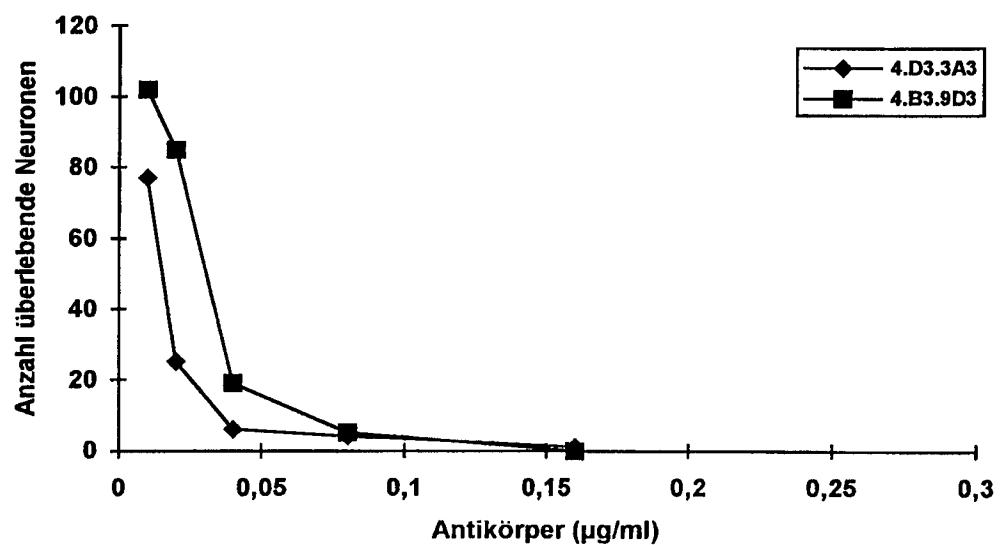
Fig. 1

Fig. 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Application No
PCT/EP 97/05956

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C07K16/22 C12N5/20 C12P21/08 G01N33/577 G01N33/68

According to International Patent Classification(IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 C07K C12N C12P G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>K. MATSUMOTO ET AL.: "Expression of brain-derived neurotrophic factor and p145TrkB affects survival, differentiation, and invasiveness of human neuroblastoma cells." CANCER RESEARCH, vol. 55, no. 8, 15 April 1995, BALTIMORE, MD, USA, pages 1798-1806, XP002029405 see abstract see figure 6 see page 1799, left-hand column, line 3 - line 5</p> <p>---</p> <p>-/-</p>	1,2

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

1

Date of the actual completion of the international search

8 April 1998

Date of mailing of the international search report

17/04/1998

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Nooij, F

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 97/05956

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>A. GHOSH ET AL.: "Requirement for BDNF in activity-dependent survival of cortical neurons." SCIENCE, vol. 263, no. 5153, 18 March 1994, WASHINGTON, DC, VSA, pages 1618-1623, XP002029406 see page 1620, middle column, line 19 - page 1621, right-hand column, line 19 ----</p>	1,2
X	<p>S. COHEN-CORY ET AL.: "Effects of brain-derived neurotrophic factor on optic axon branching and remodelling in vivo." NATURE, vol. 378, no. 6553, 9 November 1995, LONDON, GB, pages 192-196, XP002029407 see abstract see figure 1 ----</p>	1,2
A	<p>S. RADKA ET AL.: "Presence of brain-derived neurotrophic factor in brain and human and rat but not mouse serum detected by a sensitive and specific immunoassay." BRAIN RESEARCH, vol. 709, no. 1, 12 February 1996, AMSTERDAM, NL, pages 122-130, XP000670771 cited in the application see the whole document ----</p>	1-3,8,10
A	<p>R. GÖTZ ET AL.: "Neurotrophin-6 is a new member of the nerve growth factor family." NATURE, vol. 372, no. 6503, 17 November 1994, LONDON, GB, pages 266-269, XP002029408 see figure 1 ----</p>	6
A	<p>WO 93 09798 A (REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.) 27 May 1993 see claims ----</p>	1-10
A	<p>R. GÖTZ ET AL.: "Brain-derived neurotrophic factor is more highly conserved in structure and function than nerve growth factor during vertebrate evolution." JOURNAL OF NEUROCHEMISTRY, vol. 59, no. 2, August 1992, NEW YORK, NY, VSA, pages 432-442, XP000670104 cited in the application see the whole document -----</p>	6
1		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT**Information on patent family members**

In. national Application No

PCT/EP 97/05956

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9309798 A	27-05-93	AU 3130493 A CN 1073264 A PT 101051 A ZA 9208730 A	15-06-93 16-06-93 28-02-94 10-05-93

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 97/05956

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 C07K16/22 C12N5/20 C12P21/08 G01N33/577 G01N33/68

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprässtoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 6 C07K C12N C12P G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprässtoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie ³	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	K. MATSUMOTO ET AL.: "Expression of brain-derived neurotrophic factor and p145TrkB affects survival, differentiation, and invasiveness of human neuroblastoma cells." CANCER RESEARCH, Bd. 55, Nr. 8, 15. April 1995. BALTIMORE, MD, VSA, Seiten 1798-1806, XP002029405 siehe Zusammenfassung siehe Abbildung 6 siehe Seite 1799, linke Spalte, Zeile 3 - Zeile 5 ---- -/-	1, 2

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

³ Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert.
aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfindenscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindenscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

1

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
8. April 1998	17/04/1998
Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl. Fax: (+31-70) 340-3016	Bevollmächtigter Bediensteter Nooij, F

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 97/05956

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>A. GHOSH ET AL.: "Requirement for BDNF in activity-dependent survival of cortical neurons."</p> <p>SCIENCE, Bd. 263, Nr. 5153, 18. März 1994, WASHINGTON, DC, VSA, Seiten 1618-1623, XP002029406 siehe Seite 1620, mittlere Spalte, Zeile 19 - Seite 1621, rechte Spalte, Zeile 19</p> <p>---</p> <p>S. COHEN-CORY ET AL.: "Effects of brain-derived neurotrophic factor on optic axon branching and remodelling in vivo."</p> <p>NATURE, Bd. 378, Nr. 6553, 9. November 1995, LONDON, GB, Seiten 192-196, XP002029407 siehe Zusammenfassung siehe Abbildung 1</p> <p>---</p> <p>S. RADKA ET AL.: "Presence of brain-derived neurotrophic factor in brain and human and rat but not mouse serum detected by a sensitive and specific immunoassay."</p> <p>BRAIN RESEARCH, Bd. 709, Nr. 1, 12. Februar 1996, AMSTERDAM, NL, Seiten 122-130, XP000670771 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument</p> <p>---</p>	1,2
X	<p>R. GÖTZ ET AL.: "Neurotrophin-6 is a new member of the nerve growth factor family."</p> <p>NATURE, Bd. 372, Nr. 6503, 17. November 1994, LONDON, GB, Seiten 266-269, XP002029408 siehe Abbildung 1</p> <p>---</p>	1,2
A	<p>WO 93 09798 A (REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.) 27. Mai 1993 siehe Ansprüche</p> <p>---</p>	1-3,8,10
A	<p>R. GÖTZ ET AL.: "Brain-derived neurotrophic factor is more highly conserved in structure and function than nerve growth factor during vertebrate evolution."</p> <p>JOURNAL OF NEUROCHEMISTRY, Bd. 59, Nr. 2, August 1992, NEW YORK, NY, VSA, Seiten 432-442, XP000670104 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument</p> <p>-----</p>	6
1		1-10
		6

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 97/05956

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9309798 A	27-05-93	AU 3130493 A CN 1073264 A PT 101051 A ZA 9208730 A	15-06-93 16-06-93 28-02-94 10-05-93